家蚕半乳糖凝集素 BmGalectin-4 的表达、纯化及性质分析

王 鹏, 王 维, 吕志强*

(西北农林科技大学植物保护学院, 陕西杨凌 712100)

摘要:【目的】鉴定一种新的家蚕 *Bombyx mori* 半乳糖凝集素(galectin)基因,分析其序列和结构特征,测定其在微生物感染后的表达变化,分析其重组表达蛋白与微生物及微生物表面多糖分子的结合特性。【方法】利用 TBlastN 从家蚕基因组数据库中搜索得到一种新的半乳糖凝集素基因,命名为 *BmGalectin*-4。利用生物信息学分析其序列和结构特征,用半定量 RT-PCR 检测家蚕分别感染病原菌绿脓杆菌 *Pseudomonas aeruginosa*、金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 和白色念珠菌 *Candidiasis albicans* 后 *BmGalectin*-4 在不同组织中的表达变化,采用原核表达技术对该基因进行重组表达,并利用亲和层析得到纯化的蛋白。通过 ELISA 检测 BmGalectin-4 与细菌和真菌的结合;通过 Western blot 检测它与多糖的结合。【结果】序列分析显示,BmGalectin-4 是一种串联重复型半乳糖凝集素,含有 2 个糖识别结构域,其结构非常保守。RT-PCR 检测表明,*BmGalectin*-4 在家蚕脂肪体、血细胞和中肠中都有表达,且感染细菌和真菌后其表达有显著变化。纯化的重组 BmGalectin-4 与革兰氏阳性菌、阴性菌和真菌有较强的结合,与微生物表面多糖的结合试验表明其识别有较高的特异性。【结论】BmGalectin-4 是一个典型的串联重复型半乳糖凝集素,可能参与家蚕对病原微生物的免疫防御反应。本研究为进一步研究昆虫中半乳糖凝集素的功能奠定了基础。

关键词: 家蚕; 微生物感染; 半乳糖凝集素; 重组蛋白; 多糖; 糖结合

中图分类号: Q966 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296(2014)07-0806-09

Expression, purification and characterization of a galectin in the silkworm (*Bombyx mori*)

WANG Peng, WANG Wei, LÜ Zhi-Qiang* (College of Plant Protection, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract:【Aim】To identify a novel galectin gene from the silkworm, *Bombyx mori*, analyze its sequence and structural characteristics, detect its expression after microbial challenge and measure the binding properties of the expressed recombinant protein with microbe and microbial surface polysaccharides.【Methods】We used TBlastN to identify a novel galectin gene (named *BmGalectin*-4) by searching the silkworm genome database, and analyzed its sequence and structural characteristics with bioinformatics tools. The expression of *BmGalectin*-4 in different tissues in larval silkworm after microbial challenge (inoculation of *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Candidiasis albicans*, respectively) was detected by RT-PCR. The recombinant protein was produced in *Escherichia coli* and purified by affinity chromatography. The binding property of BmGalectin-4 with bacteria and fungus was analyzed by ELISA. Western blot was used to detect its binding to polysaccharides.【Results】Sequence analysis showed that BmGalectin-4 is a tandem repeat galectin, containing two carbohydrate recognition domains. *BmGalectin*-4 was expressed in fat body, hemocytes and midgut tissues, and its expression level changed significantly after bacterial and fungal challenge. Purified recombinant BmGalectin-4 showed significant binding capacity to Gram-positive and Gram-negative bacteria and fungus. Its binding to microbial surface polysaccharides was highly specific.【Conclusion】BmGalectin-4 is a typical tandem repeat galectin and might be involved in the silkworm immune responses against microbial pathogens. This study provides the foundation for further functional study of the silkworm galectin.

基金项目: 国家重点基础研究发展规划("973"计划)项目(2012CB114604)

作者简介: 王鹏, 男, 1988 年生, 河南郑州人, 硕士研究生, 主要从事昆虫免疫学研究, E-mail: wang.peng09@qq.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: zhiqiang.lu@nwsuaf.edu.cn

收稿日期 Received: 2014-04-01; 接受日期 Accepted: 2014-05-28

Key words: *Bombyx mori*; microbial challenge; galectin; recombinant protein; polysaccharide; saccharide binding

半乳糖凝集素(galactin)是凝集素家族中分布较为广泛的一种,因其能特异性地结合半乳糖苷而得名。对其序列的进化分析表明它们非常古老而保守,大约在 8 亿年前就已经分化出来(Kasai and Hirabayashi, 1996; Cooper and Barondes, 1999)。半乳糖凝集素都含有糖识别结构域(carbohydrate recognition domain, CRD),根据其结构域的组织形式,一般被分为 3 种类型:原型、嵌合型和串联重复型。其中原型只含有 1 个 CRD 结构域,并且会形成非共价结合的同源二聚体;嵌合型含有 1 个 C 端 CRD 结构域和 N 端富含脯氨酸和甘氨酸的结构域;串联重复型含有 2 个 CRD 结构域,中间由一段功能肽段连接(Hirabayashi and Kasai, 1993)。

半乳糖凝集素最早在哺乳动物中发现,迄今为止已经有 15 种哺乳动物中的半乳糖凝集素被发现和命名,分别被称为 galectin-1-galectin-15。半乳糖凝集素广泛存在于大部分免疫相关细胞中,包括巨噬细胞、肥大细胞、杀伤细胞、激活的 B 细胞和 T 细胞(Li *et al.*, 2011; Cedeno-Laurent and Dimitroff, 2012)。它们通过与细胞表面的糖复合物结合来传递多种胞间信号,参与炎症反应、抗凋亡作用、诱导趋化性、氧化活力等反应(Partridge *et al.*, 2004; Ohtsubo *et al.*, 2005; Rabinovich *et al.*, 2007; Stowell *et al.*, 2008)。此外,还有研究表明,半乳糖凝集素可以作为模式识别受体(pattern recognition receptor, PRR),识别外来病原微生物表面的半乳糖苷,引起免疫反应的激活(Mey *et al.*, 1996)。

在昆虫体内,对半乳糖凝集素的研究主要集中在对昆虫胚胎发育的影响及与昆虫体内寄生虫的相互作用(Pace *et al.*, 2002; Kamhawi *et al.*, 2004)。比如在白蛉 *Phlebotomus papatasi* 的中肠中,有一种串联重复型半乳糖凝集素 PpGalec,它能特异性识别利什曼原虫 *Leishmania major* 表面的磷酸酯多糖(lipophosphoglycan, LPG),使其能结合在白蛉的中肠上表皮,然后在白蛉肠道内发育成为能附着在肠道上皮细胞的前鞭毛体,防止其随着排泄物被排出体外(Kamhawi *et al.*, 2004)。此外,在疟蚊 *Anopheles stephensi*、长红猎蝽 *Rhodnius prolixus* 和冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* 等昆虫体内都有半乳糖凝集素被发现(Dimopoulos *et al.*, 1996; Basseri *et al.*, 2002; Valenzuela *et al.*, 2003)。但是半乳糖凝集素在昆虫免疫系统中的作用少有报道,其识别外来物如细菌、真菌、寄生虫等表面多糖的证据仍很有限。

本研究从家蚕 *Bombyx mori* 基因组数据库中鉴定得到了一个串联重复型半乳糖凝集素基因,命名为 *BmGalectin*-4(*GLT*4)。我们对序列进行了生物信息学分析,在核酸水平检测其在感染病原菌后的表达变化,克隆并在大肠杆菌 *Escherichia coli* 中重组表达了这个基因,利用纯化的重组蛋白进行了与革兰氏阳性及阴性菌、真菌的结合试验。

1　材料和方法

1.1　供试昆虫

家蚕 Nistari 品种,采用新鲜桑叶在人工气候培养箱饲养,饲养温度为 27 ± 1℃,相对湿度 70% ~ 80%,光周期为 14L∶10D。

1.2　主要试剂和仪器

Tri-Pure, 购自 Roche 公司; Taq DNA Polymerase, M-MLV Reverse Transcriptase, Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity 购自 Invitrogen 公司;JM109 和 BL21(DE3)感受态细胞,pMD19-T Vector,购自 TaKaRa 公司;Plasmid Mini Kit,Gel Extraction Kit 购自 Omega 公司;Direct-zol™ RNA MiniPrep,购自 Zymo Research 公司;Anti-C-Myc 多克隆抗体,购自 Cwbio 公司;Goat anti-Rabbit HRP 抗体,购自 Santa Cruz 公司;ECL Chemiluminescence Detection Kit,购自 GE 公司;SUMO 酶,购自 Vazyme 公司;可溶型单组份 TMB 底物溶液,购自天根公司;Curdlan,购自 Sigma 公司;藤黄微球菌 *Micrococcus luteus*, 巨大芽孢杆菌 *Bacillus megaterium*, 枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 肽聚糖(peptidoglycan, PG)和 pSFM 质粒由 Oklahoma State 大学 Haobo Jiang 教授惠赠。

Bioer Life Pro PCR 仪,Harlow Scientific 公司;UVP 凝胶成像系统,UVP 公司;化学发光成像系统,上海勤翔科学仪器有限公司;全功能酶标仪,Tecan 公司。

1.3　序列分析

我们以白蛉 *P. papatasi* 串联重复型半乳糖凝集素(GenBank 登录号: AAT11557.1)蛋白序列通

过 TBlastN 搜索家蚕全长 cDNA 数据库（http://kaikoblast.dna.affrc.go.jp），再用得到的家蚕 BmGalectin-4 进行 Blastp 搜索 NCBI 数据库，得到其他物种相似的蛋白序列。蛋白序列比对使用 Clustal Omega 软件。系统发育树采用 MEGA4.0 软件，根据邻接法（Neighbor-Joining，N-J）进行构建。结构域预测使用 Pfam（http://pfam.sanger.ac.uk/）。蛋白质性质用 ProtParam 分析（http://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam）。N-糖基化位点预测用 NetNGlyc 1.0（http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/）。三维结构预测使用 SWISS-MODEL 工具（http://swissmodel.expasy.org/）。所有参数选择默认。

1.4 家蚕的感染与组织提取

感染所用的细菌在 LB 中，37℃ 250 r/min 培养；真菌在沙堡氏培养基中，30℃ 200 r/min 培养。当 OD_{600} 达到 0.6 左右时，8 000 r/min 4℃离心收集菌体，再用灭菌生理盐水稀释。

家蚕的注射感染：5 龄第 3 日的家蚕，分为 4 组，每组 20 头，分别注射灭菌的生理盐水、绿脓杆菌 *Pseudomonas aeruginosa*、金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 和白色念珠菌 *Candidiasis albicans* 到家蚕的血腔内。对照组每头幼虫注射 50 μL 无菌生理盐水，处理组每头幼虫注射悬浮有约 1×10^7 个细菌或真菌孢子的 50 μL 生理盐水。

家蚕的喂食感染：在幼虫进入 5 龄后开始喂食人工饲料，第 2 天在人工饲料中加入四环素（每头喂食 50 μg）以清除肠道内细菌。喂食抗生素 24 h 后，在人工饲料小块中加入灭菌生理盐水或以上 3 种菌体。感染绿脓杆菌每头喂食 2×10^9 个细菌，感染金黄色葡萄球菌每头喂食 1.4×10^8 个细菌，感染白色念珠菌每头喂食 1×10^7 个孢子，每组处理 10 头家蚕。

注射感染后分别在 8 和 24 h 收集血细胞和脂肪体，喂食感染的在相同的时间点收集中肠。置入 Tri-Pure 后于 -80℃保存。

1.5 总 RNA 提取及 cDNA 合成

使用匀浆器研磨粉碎各时间点组织样品，根据 Tri-Pure（Roche）试剂提取 RNA 的步骤提取总 RNA。将得到的总 RNA 用 Direct-zol™ RNA MiniPrep（Zymo）试剂盒纯化，并用 DNase（Promega）处理以去除基因组 DNA。取适量纯化之后的 RNA，使用 M-MLV Reverse Transcriptase（Invitrogen）反转录试剂盒合成 cDNA。

1.6 半定量 RT-PCR 检测

半定量检测采用 Taq DNA Polymerase（Invitrogen）试剂盒。引物设计根据家蚕基因组数据库 BLAST 搜索得到的序列（AK386049.1），采用 Primer Premier 软件设计引物，正向引物：5′-AAGAATTAGAGGCGGGTCGT-3′；反向引物：5′-CTGGTAGCCGGACATAGAA-3′。内参基因 *RP49* 的引物为正向引物：5′-CCTGTTTACAGGCCGACAAT-3′；反向引物：5′-GGAATCCATTTGGGAGCATA-3′。反应条件如下：94℃预变性 2 min，94℃变性 30 s，50℃退火 30 s，72℃延伸 45 s，35 个循环，72℃补偿延伸 5 min。

1.7 克隆与测序

针对 *BmGalectin*-4 序列设计一对分别含 *Nde* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ酶切位点的特异性引物，正向引物：5′-GCATATGCAAGGCAAGTGCGGTTGT-3′，反向引物：5′-GCTCGAGTCTTATCGGTGTGCTGGTA-3′，以 cDNA 为模板，使用 Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity（Invitrogen）试剂盒进行 PCR 反应，扩增产物电泳分离检测，切胶回收，与载体 pMD19-T 连接，并转化到 JM109 中，蓝白斑筛选，双酶切鉴定后，送往上海桑尼公司测序。

1.8 BmGalectin-4 的重组表达与纯化

表达纯化所用质粒 pSFM 由 pET28b 改造而来（Chen *et al.*，2014）。将测序正确的 PCR 片段经双酶切回收后连接到表达质粒 pSFM，并转化到大肠杆菌 *E. coli* BL21（DE3）中，用含卡那霉素（50 μg/mL）的 LB 平板进行筛选，挑取阳性克隆，在 LB 培养基中培养至 OD_{600} 值 0.6~0.8，加入 IPTG（终浓度 0.5 mmol/L），在 25℃ 150 r/min 过夜诱导。8 000 r/min 4℃离心收集菌体，再用 5 倍体积 PBS 重悬菌体，加入溶菌酶（0.1 mg/mL）后超声破碎，离心取上清。纯化重组蛋白采用 QIAGEN 公司的 Ni-NTA Superflow。纯化后的重组蛋白透析到 SUMO 酶（Vazyme 公司）酶切缓冲液（50 mmol/L Tris-HCl，pH 8.0，0.2% NP-40，150 mmol/L NaCl，1 mmol/L DTT）中，在 4℃过夜酶切，之后再次过镍柱，最后将蛋白浓缩透析至 PBS（140 mmol/L NaCl，2.68 mmol/L KCl，10 mmol/L Na_2HPO_4，1.76 mmol/L KH_2PO_4）中，分装保存在 -80℃。

1.9 ELISA 检测 BmGalectin-4 与绿脓杆菌、金黄色葡萄球菌和白色念珠菌的结合

将 96 孔酶标板（Corning Costar）用含 0.05%（w/v）多聚赖氨酸 poly-L-lysine（MP）的包被液（15

mmol/L Na_2CO_3, 35 mmol/L $NaHCO_3$, pH 9.6）室温包被 1 h，之后用 200 μL PBS 洗两次。将绿脓杆菌、金黄色葡萄球菌和白色念珠菌培养到 OD_{600}值为0.8 左右，并在包被液中重悬使其终浓度为 10^8 CFU/mL。将菌液（100 μL/孔）加入 96 孔板中，4℃孵育过夜。再加入 200 μL 3% 的脱脂奶粉，37℃孵育 1 h，然后用 PBST（含 0.05% Tween-20 的 PBS）洗板 5 次。加入不同浓度的 BmGalectin-4 蛋白或 SUMO 融合蛋白（空质粒表达纯化），PBS 作为阴性对照，22℃孵育 2 h，再用 PBST 洗板 3 次。加入 100 μL 一抗 anti-C- Myc（1∶1 000, v/v），37℃孵育 1 h，PBST 洗板 3 次。再加入 100 μL 二抗 Goat Anti-Rabbit HRP（1∶1 000, v/v），37℃孵育 1 h，PBST 洗板 5 次。加入 TMB 底物 100 μL，显色 20 min，最后加入 100 μL 终止液，使用酶标仪在 450 nm 下读数。将至少 2 倍于对照读数的结果定义为阳性，结合指数定义为：蛋白的 A_{450}读数/PBS 的 A_{450}读数。

1.10　BmGalectin-4 蛋白与病原菌表面多糖的结合

我们主要检测了 BmGalectin-4 与藤黄微球菌 *M. luteus*、金黄色葡萄球菌 *S. aureus*、大肠杆菌 *E. coli*、枯草芽孢杆菌 *B. subtilis*、巨大芽孢杆菌 *B. megaterium* 等细菌的肽聚糖及真菌凝胶多糖（curdlan）等不溶性多糖的结合。

首先将 PG 或 curdlan 在 100℃处理 5 min 以变性可能存在的蛋白酶，将 10 μL BmGalectin-4 蛋白（200 μg/mL）与 10 μL PG（2 mg/mL）或 curdlan（2 mg/mL），及 20 μL PBS 一起在室温震荡孵育 2 h。然后 4℃ 14 000 r/min 离心 15 min，保留上清，标记为“未结合”。对沉淀用含 500 mmol/L NaCl 的 PBS 200 μL 悬浮洗涤 5 min，4℃ 14 000 g 离心 15 min，重复 3 次，保留每次上清。最后向沉淀中加入 20 μL PBS 与 20 μL 4×SDS loading buffer，100℃处理 5 min 后离心保留上清部分，标记为“结合”，同时将每次洗涤上清部分同样处理。取 10 μL 样品使用 10% SDS-PAGE 分离，随后将凝胶中样品用湿法电转移至 PVDF 膜上，用 Western Blot 检测结合结果，一抗为 anti-C-Myc（Cwbio，10 000 倍稀释），二抗为 Goat Anti-Rabbit IgG（Santa Cruz，5 000 倍稀释）。

2　结果与分析

2.1　家蚕半乳糖凝集素基因的序列特征

我们在家蚕全长 cDNA 数据库中搜索得到一条全长为 1 645 bp 的 cDNA，将其命名为 *BmGalectin*-4（GenBank 登录号：AK386049），其 ORF 编码含有 363 个氨基酸残基的蛋白。其理论分子量为 41 273，等电点为 6.38。Pfam 数据库检索表明该蛋白包含 2 个糖识别结构域 CRD，分别位于第 46－178 和 216－351 位氨基酸残基之间，由一个 38 个氨基酸残基的肽段连接。和其他半乳糖凝集素相似，BmGalectin-4 没有信号肽，但它具有一个潜在的 N-糖基化位点（Asn^{46}-Phe^{47}-Thr^{48}）。序列比对显示（图 1），BmGalectin-4 与其他串联重复型半乳糖凝集素（包括来自其他昆虫类群和人及小鼠）具有很高的保守性。与半乳糖结合特性相关的关键氨基酸在 BmGalectin-4 全部保留，包括 N-端 CRD 中的 H_{93}, N_{95}, R_{97}, V_{104}, N_{106}, W_{113} 和 E_{116} 及 C-端 CRD 中的 H_{263}, N_{265}, R_{267}, V_{280}, N_{282}, W_{288} 和 E_{291}（Sujatha and Balaji, 2004）。系统进化分析揭示（图 2），来自昆虫、线虫和哺乳动物的串联重复型半乳糖凝集素形成了 3 个非常明显的簇群。

2.2　BmGalectin-4 的三维结构

以人 Galectin-8 的结构（4hanB）为模板，利用 Swiss-model 中进行三维空间结构预测（Guex and Peitsch, 1997; Schwede *et al.*, 2003; Arnold *et al.*, 2006）。蛋白质结构覆盖了 BmGalectin-4 第 41－352 位氨基酸，序列一致性为 22.397%，Z-Score 为 －3.729，拉氏图显示 95% 的氨基酸在合理区域，表明具有稳定的空间结构。从图 3 可以看到，2 个 CRD 结构域由 30 个氨基酸的肽段连接到一起，其中 12 个氨基酸形成了 2 个短的 α 螺旋；在 2 个 CRD 结构域中，分别由两层相互平行的 β 折叠形成了 β 三明治结构，其中 S1～S6 片层在内侧形成凹面，F1～F4 片层在外侧形成凸面（其中 S5 由于折叠同时存在于内侧和外侧），形成了典型的半乳糖凝集素的 CRD 结构。

2.3　家蚕 *BmGalectin*-4 在微生物感染后的表达变化

通过半定量 RT-PCR 检测，我们发现 *BmGalectin*-4 在脂肪体、中肠和血细胞中都有表达（图 4）。在血细胞中，除了在绿脓杆菌感染 24 h 其表达与对照相比变化不大外，其他 3 种微生物感染均引起 *BmGalectin*-4 表达显著下调。在脂肪体中，白色念珠菌感染引起其表达略微下调，而在两种细菌感染后表达无明显变化。喂食感染方式下，在中肠组织中，绿脓杆菌感染引起 *BmGalectin*-4 表达略有升高；金黄色葡萄球菌感染后 8 h 表达显著降低；白色念珠菌感染后在 8 h 显著减低，但在 24 h 明显升高。

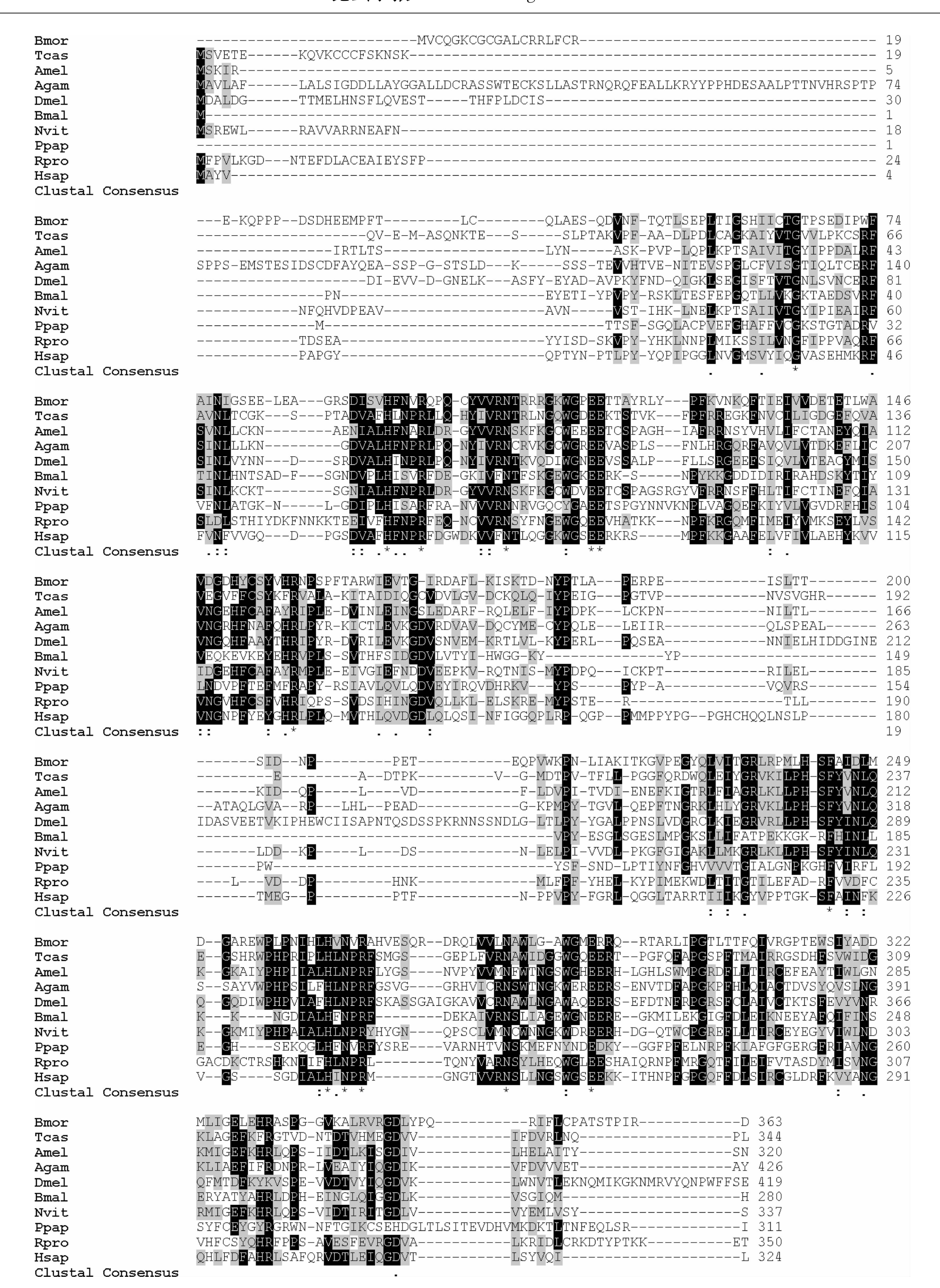


图 1 串联重复型半乳糖凝集素蛋白序列比对

Fig. 1 Protein sequence alignment of tandem-repeat galectins

序列来源及序列号 Origin of galectins and their GenBank accession numbers：Aaeg：埃及伊蚊 *Aedes aegypti*（XP_001656933.1）；Agam：冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae*（AGAP008844-PA）；Amel：西方蜜蜂 *Apis mellifera*（XP 001121099.2）；Bmal：马来丝虫 *Brugia malayi*（AAF37721.1）；Bmor：家蚕 *Bombyx mori*（AK386049）；Dmel：黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*（NP 001162838.1）；Dple：帝王蝶 *Danaus plexippus*（EHJ77864.1）；Hcon：似血矛线虫 *Haemonchus contortus*（AAD11972.1）；Hcor：人体虱 *Pediculus humanus corporis*（XP 002428817.1）；Hsal：印度蚂蚁 *Harpegnathos saltator*（EFN82261.1）；Hsap：人 *Homo sapiens*（NP 006140.1）；Mmus：小鼠 *Mus musculus*（NP 034836.1）；Nvit：金小蜂 *Nasonia vitripennis*（XP 001601979.1）；Ppap：白蛉 *Phlebotomus papatasi*（AAT11557.1）；Rpro：长红猎蝽 *Rhodnius prolixus*（JAA77473.1）；Tcas：赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*（XP 971732.1）. 图 2 同 The same for Fig. 2.

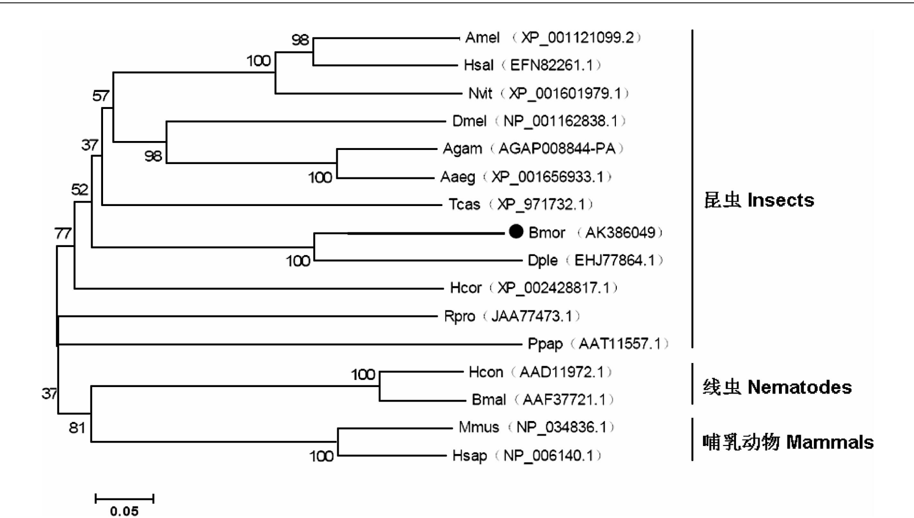


图 2　串联重复型半乳糖凝集素蛋白进化树

Fig. 2　Phylogenetic tree of tandem-repeat galectins

首先利用 Clustal Omega 进行序列比对，然后构建 NJ 系统进化树。系统树各分支上数字为 Bootstrap 值，表示 1 000 次循环检验的置信度；标尺示遗传距离。The sequences were aligned by Clustal Omega and then a phylogenetic tree was constructed by NJ. Bootstrap values (%) based on 1 000 replicates are indicated on the branches. The scale bar represents the genetic distance.

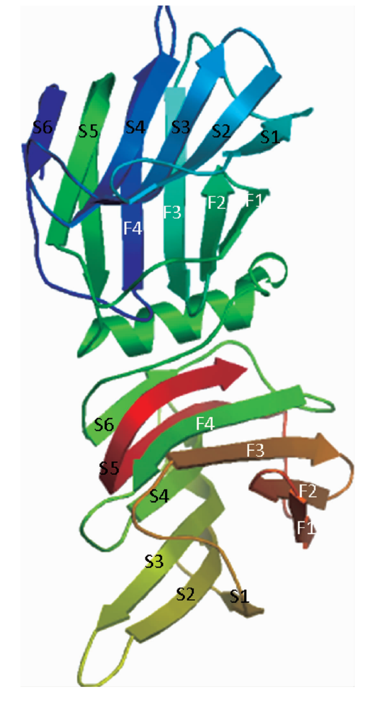


图 3　家蚕 BmGalectin-4 的三维结构

Fig. 3　Three-dimensional structure of BmGalectin-4 from *Bombyx mori*

F1 ~ F4 片层在外侧形成凸面，S1 ~ S6 片层在内侧形成凹面，其中 S5 同时存在内侧和外侧。Convex surface is formed by F1 – F4 β-sheets, and concave surface is formed by S1 – S6 β-sheets, among which S5 simultaneously presents on both surfaces.

2.4　家蚕 BmGalectin-4 的重组表达与蛋白纯化

BmGalectin-4 基因片段插入表达质粒 pSFM 进行表达，重组蛋白 N 端 SUMO 酶切位点之前有包含 6 × His 标签与 SUMO 的肽段，C 端序列最后还有 FLAG 标签和 C-Myc 标签（Chen *et al.*, 2014）。将诱导后的菌体破碎后离心得到的上清过镍柱，目的蛋白(约 56 kD)在 100 mmol/L 咪唑洗脱下来。经 SUMO 酶切、透析后再次过镍柱，目的蛋白在 20 mmol/L 咪唑洗下来。SDS-PAGE 后经银染在 43 kD 附近检测到单一目的条带(图 5：A)，Western 印迹分析也在相同位置检测到明显条带(图 5：B)，表明我们纯化得到带有 C-Myc 标签的重组 BmGalectin-4。

2.5　BmGalectin-4 与病原菌的相互作用

为了检测 BmGalectin-4 能否与病原菌进行相互作用，我们使用不同浓度的重组蛋白与革兰氏阴性菌绿脓杆菌、革兰氏阳性菌金黄色葡萄球和真菌白色念珠菌分别孵育，然后进行 ELISA 检测，发现蛋白会随着浓度的升高更好地与病菌结合，结合指数最高达到 5 左右(图 6)。而作为对照的 SUMO 蛋白与 3 种病原菌的结合并没有随着浓度的升高而增强，结合指数维持在 1 左右(图 6)，说明对照蛋白并不能与病原菌结合，BmGalectin-4 与病原菌的结合是真实的。

2.6　BmGalectin-4 与多糖的结合

BmGalectin-4 与微生物表面的多糖结合试验显示(图 7)：BmGalectin-4 与阳性菌巨大芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌的肽聚糖有明显的结合，与阴性菌大肠杆菌的肽聚糖也有明显的结合；与真菌凝胶多糖有较强的结合；与枯草芽孢杆菌肽聚糖结合很微弱。与藤黄微球菌肽聚糖的结合试验中，我们在洗涤和结合的部分中均没有检测到 BmGalectin-4，原因未知。

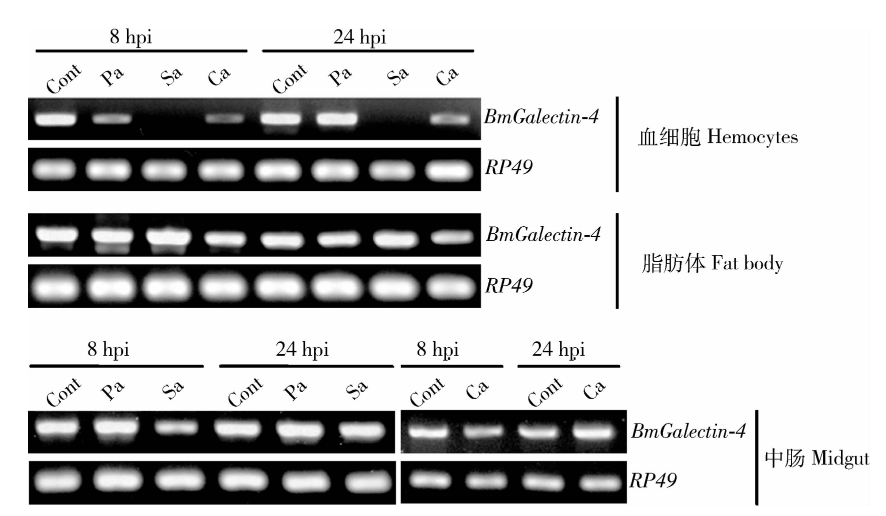


图 4 微生物感染后 *BmGalectin*-4 在家蚕主要免疫组织中的表达变化

Fig. 4 Expression of *BmGalectin*-4 in immune tissues of *Bombyx mori* after microbial challenge

血细胞和脂肪体取自注射感染后的幼虫，中肠组织取自喂食感染后的幼虫。Hemocytes and fat body were collected from larvae injected with microbes; midgut tissues were collected from orally infected larvae. hpi：感染后时间(h) Hours post infection; Cont：对照 Control; Pa：绿脓杆菌 *Pseudomonas aeruginosa*; Sa：金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*; Ca：白色念珠菌 *Candidiasis albican*.

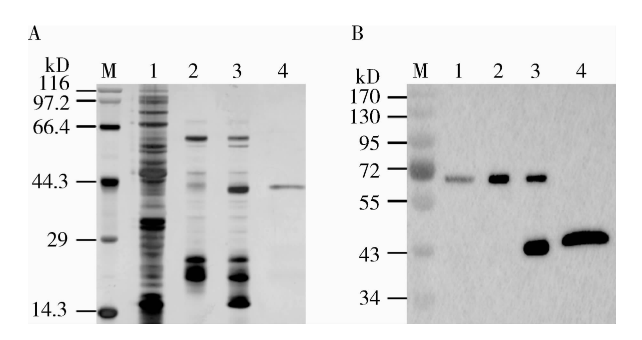


图 5 BmGalectin-4 的重组表达及纯化

Fig. 5 Expression and purification of recombinant BmGalectin-4

A：SDS-PAGE 后银染分析 Silver staining after SDS-PAGE; B：SDS-PAGE 后 Western blot 分析 Western blotting after SDS-PAGE. M：蛋白分子量标准 Protein molecular weight marker; 1：细菌裂解上清液 Supernatant of the bacterial lysate; 2：第 1 次镍柱纯化后融合蛋白 Recombinant protein after the first nickel column purification; 3：SUMO 酶切后的融合蛋白 Fusion protein after digestion with SUMO protease; 4：第 2 次镍柱纯化后融合蛋白 Recombinant protein after the second nickel column purification.

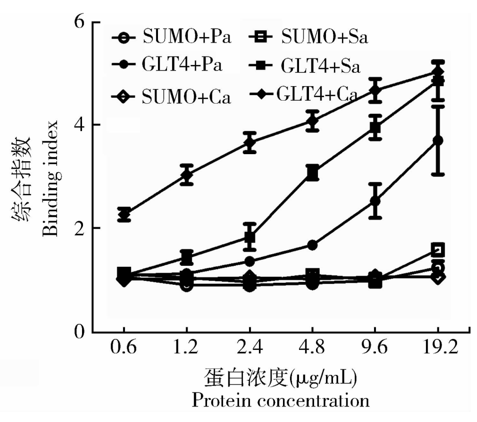


图 6 BmGalectin-4 与细菌和真菌的结合

Fig. 6 Binding of BmGalectin-4 to bacteria and fungus

Pa：绿脓杆菌 *Pseudomonas aeruginosa*; Sa：金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*; Ca：白色念珠菌 *Candidiasis albican*. 绿脓杆菌、金黄色葡萄球菌和白色念珠菌与不同浓度的 BmGalectin-4 (GLT4)或 SUMO 蛋白(对照)孵育后，使用 ELISA 检测蛋白与微生物的结合。使用结合指数来判断结合强度，结合指数 = 蛋白的 A_{450} 读数/PBS 的 A_{450} 读数；结果是 3 次重复的平均值。*P. aeruginosa*, *S. aureus* and *C. albicans* were incubated with different concentrations of BmGalectin-4 (GLT4) or SUMO protein (the control), and protein binding to microbe cells was determined by ELISA. Values are shown as binding index, which was calculated as follows: A_{450} of protein/A_{450} of PBS. The results were the means of three independent assays.

3 讨论

本研究从家蚕基因中筛选克隆出了一个半乳糖凝集素基因 *BmGalectin*-4，通过对其序列和蛋白结构的分析，我们发现这个半乳糖凝集素是由 2 个 CRD 结构域串联而成的，具有相同结构的还有哺乳动物的 galectin-4, galectin-6, galectin-8, galectin-9 和 galectin-12。对串联重复型半乳糖凝集素的系统进化分析发现，双翅目白蛉*P. papatasi*并未和同目的黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*、冈比亚按蚊 *A. gambiae* 及埃及伊蚊 *Aedes aegypti* 归在一起，而是和鳞翅目的家蚕及帝王蝶 *Danaus plexippus* 归在一起(图 2)。这可能是由于白蛉的串联重复型半乳糖凝集素是中肠特异性的(Kamhawi *et al.*, 2004)，在适

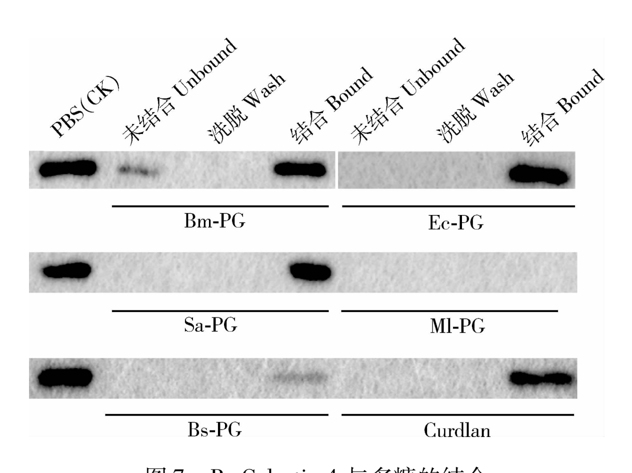


图 7　BmGalectin-4 与多糖的结合

Fig. 7　Binding of BmGalectin-4 to polysaccharides

Bm：巨大芽孢杆菌 *Bacillus megaterium*；Bs：枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*；Sa：金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*；MI：藤黄微球菌 *Micrococcus luteus*；PG：肽聚糖 Peptidoglycan；Curdlan：凝胶多糖.

应中肠组织特殊的生理生态环境的过程中，出现了新的特性。从序列比对我们发现，白蛉串联重复型半乳糖凝集素中有几个和半乳糖结合相关的关键氨基酸发生了突变，比如其第 50 位的 N 变为 S，第 68 位的 W 变为 Y，第 213 位的 V 变为 A，第 224 位的 W 变为 Y（图 1）。另外，BmGalectin-4 不含有典型的分泌信号肽，可能是和哺乳动物一样通过一种非典型途径来分泌（Hughes，1999）。我们依据 galectin-8 的晶体结构预测了 BmGalectin-4 的结构模型，结果显示出 2 个 CRD 结构域都具有典型的半乳糖凝集素结构的空间特征。已经检测过的一些动物半乳糖凝集素表明，乳糖和相关的 β-半乳糖苷识别的糖特异性结合位点具有相同的空间结构。Galectin-1 和 galectin-2 的 X 射线晶体衍射证实了这种保守的相互作用（Lobsanov *et al.*，1993；Liao *et al.*，1994）。我们预测 BmGalectin-4 同样是由 CRD 凹槽内的氨基酸基团和相应的糖结合（Yoshida *et al.*，2012）。有趣的是 BmGalectin-4 的 2 个 CRD 结构域的空间结构极其相似，都是由 10 条 β 折叠片层组成，其中 5 条在内侧，4 条在外侧，同时都有 1 条 β 折叠片层（S5）延伸到内侧和外侧 2 部分。这种相似性可能暗示着 2 个 CRD 结构域有着相似的结合能力。

为了进一步探索其功能，我们重组表达了 BmGalectin-4，并用纯化的蛋白进行了与病原菌及病原菌多糖的结合试验。结果发现 BmGalectin-4 对革兰氏阴性菌、阳性菌和真菌的菌体都有明显的结合，并且这种结合会随着蛋白浓度的增大而增强。但当我们用不同病原菌表面多糖进行结合试验时，发现它们与 BmGalectin-4 的结合呈现出了强弱有无的变化，说明病原菌表面的糖分子结构复杂多变，而半乳糖凝集素对其结合有很高的特异性。BmGalectin-4 在家蚕的脂肪体、血细胞和中肠组织中都有表达，说明 BmGalectin-4 在不同组织中广泛存在，这与果蝇半乳糖凝集素 Dmgal 的结果是一致的（Pace *et al.*，2002）。在细菌和真菌感染后，BmGalectin-4 在血细胞中表达的总体趋势是减弱，这种表达的减弱和微生物的入侵以及家蚕的防御反应之间有什么关系，我们目前则无任何线索。这需要结合体内实验进一步研究。

对哺乳动物半乳糖凝集素的研究已经证实，通过调节免疫细胞的生存、活化、分化和细胞因子的平衡，半乳糖凝集素在抵抗传染性疾病方面起关键作用（Rabinovich and Gruppi，2005；Toscano，2007；Yang *et al.*，2008；Rabinovich and Toscano，2009）。同时越来越多的证据表明，半乳糖凝集素在识别自身体内多糖的同时，作为模式识别受体与其他生物的相互作用同样举足轻重（Mey *et al.*，1996；Sato and Nieminen，2004；Lee，2007）。但是半乳糖凝集素在识别外来病原物如真菌、细菌和寄生虫等表面多糖的证据仍很有限，目前只发现少数半乳糖凝集素与具有特殊结构的糖结合，我们对这些凝集素蛋白和糖类的种类和特征认识还非常有限，对识别之后的信息传递也不清楚。在我们的实验中，发现 BmGalectin-4 能结合微生物及其表面的多糖分子，但并不能引起家蚕的免疫反应，比如血淋巴中黑化反应和血细胞的吞噬作用（数据未展示）。正如前面所述，BmGalectin-4 与病原物及其表面多糖分子之间的结合和家蚕的免疫反应之间究竟有何联系，目前仍然是一个问题。

昆虫仅有先天免疫而没有获得性免疫，利用昆虫作为对象研究半乳糖凝集素，可以排除获得性免疫的干扰，使我们更清楚地了解半乳糖凝集素在天然免疫中所起到的作用。家蚕作为一种模式昆虫，基因组中预测的半乳糖凝集素基因相对较少，且家蚕饲养方便，繁殖速度快，是一种理想的研究对象。本研究对家蚕半乳糖凝集素进行了初步探究，制备了重组蛋白，明确了其对细菌和真菌的结合能力，为将来进一步的研究打下基础。

参考文献（References）

Arnold K，Bordoli L，Kopp J，Schwede T，2006. The SWISS-MODEL

Workspace: a web-based environment for protein structure homology modeling. *Bioinformatics*, 22(2): 195 - 201.

Basseri HR, Tew IF, Ratcliffe NA, 2002. Identification and distribution of carbohydrate moieties on the salivary glands of *Rhodnius prolixus* and their possible involvement in attachment/invasion by *Trypanosoma rangeli*. *Exp. Parasitol.*, 100(4): 226 - 234.

Cedeno-Laurent F, Dimitroff CJ, 2012. Galectin-1 research in T cell immunity: past, present and future. *Clin. Immunol.*, 142(2): 107 - 116.

Chen K, Liu C, He Y, Jiang H, Lu Z, 2014. A short-type peptidoglycan recognition protein from the silkworm: expression, characterization and involvement in the prophenoloxidase activation pathway. *Developmental & Comparative Immunology*, 45(1): 1 - 9.

Cooper DN, Barondes SH, 1999. God must love galectins; he made so many of them. *Glycobiology*, 9(10): 979 - 984.

Dimopoulos G, Richman A, Della Torre A, Kafatos FC, Louis C, 1996. Identification and characterization of differentially expressed cDNAs of the vector mosquito, *Anopheles gambiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93(23): 13066 - 13071.

Guex N, Peitsch MC, 1997. SWISS-MODEL and the Swiss-Pdb Viewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*, 18(15): 2714 - 2723.

Hirabayashi J, Kasai KI, 1993. The family of metazoan metal-independent beta-galactoside-binding lectins: structure, function and molecular evolution. *Glycobiology*, 3(4): 297 - 304.

Hughes RC, 1999. Secretion of the galectin family of mammalian carbohydrate-binding proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1473(1): 172 - 185.

Kamhawi S, Ramalho-Ortigao M, Pham VM, Kumar S, Lawyer PG, Turco SJ, Barillas-Mury C, Sacks DL, Valenzuela JG, 2004. A role for insect galectins in parasite survival. *Cell*, 119(3): 329 - 341.

Kasai K, Hirabayashi J, 1996. Galectins: a family of animal lectins that decipher glycocodes. *J. Biochem.* (*Tokyo*), 119(1): 1 - 8.

Lee B, 2007. Envelope-receptor interactions in Nipah virus pathobiology. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1102(1): 51 - 65.

Li YR, Feng JN, Geng SX, Wei HW, Chen GJ, Li XY, Wang LY, Wang RX, Peng H, Han GC, Shen BF, Li Y, 2011. The N- and C-terminal carbohydrate recognition domains of galectin-9 contribute differently to its multiple functions in innate immunity and adaptive immunity. *Mol. Immunol.*, 48(4): 670 - 677.

Liao DI, Kapadia G, Ahmed H, Vasta GR, Herzberg O, 1994. Structure of S-lectin, a developmentally regulated vertebrate beta-galactoside-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91(4): 1428 - 1432.

Lobsanov YD, Gitt MA, Leffler H, Barondes SH, Rini JM, 1993. X-ray crystal structure of the human dimeric S-Lac lectin, L-14-II, in complex with lactose at 2.9-Å resolution. *J. Biol. Chem.*, 268(36): 27034 - 27038.

Mey A, Leffler H, Hmama Z, Normier G, Revillard JP, 1996. The animal lectin galectin-3 interacts with bacterial lipopolysaccharides via two independent sites. *J. Immunol.*, 156(4): 1572 - 1577.

Ohtsubo K, Takamatsu S, Minowa MT, Yoshida A, Takeuchi M, Marth JD, 2005. Dietary and genetic control of glucose transporter 2 glycosylation promotes insulin secretion in suppressing diabetes. *Cell*, 123(7): 1307 - 1321.

Pace KE, Lebestky T, Hummel T, Arnoux P, Kwan K, Baum LG, 2002. Characterization of a novel *Drosophila melanogaster* galectin. Expression in developing immune, neural, and muscle tissues. *J. Biol. Chem.*, 277(15): 13091 - 13098.

Partridge EA, Le Roy C, Di Guglielmo GM, Pawling J, Cheung P, Granovsky M, Nabi IR, Wrana JL, Dennis JW, 2004. Regulation of cytokine receptors by Golgi N-glycan processing and endocytosis. *Science*, 306(5693): 120 - 124.

Rabinovich GA, Gruppi A, 2005. Galectins as immunoregulators during infectious processes: from microbial invasion to the resolution of the disease. *Parasite Immunology*, 27(4): 103 - 114.

Rabinovich GA, Toscano MA, 2009. Turning 'sweet' on immunity: galectin-glycan interactions in immune tolerance and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.*, 9(5): 338 - 352.

Rabinovich GA, Toscano MA, Jackson SS, Vasta GR, 2007. Functions of cell surface galectin-glycoprotein lattices. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 17(5): 513 - 520.

Sato S, Nieminen J, 2004. Seeing strangers or announcing "danger": galectin-3 in two models of innate immunity. *Glycoconj. J.*, 19(7 - 9): 583 - 591.

Schwede T, Kopp J, Guex N, Peitsch MC, 2003. SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Research*, 31(13): 3381 - 3385.

Stowell SR, Qian Y, Karmakar S, Koyama NS, Dias-Baruffi M, Leffler H, Mcever RP, Cummings RD, 2008. Differential roles of galectin-1 and galectin-3 in regulating leukocyte viability and cytokine secretion. *J. Immunol.*, 180(5): 3091 - 3102.

Sujatha MS, Balaji PV, 2004. Identification of common structural features of binding sites in galactose-specific proteins. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 55(1): 44 - 65.

Toscano MA, Bianco GA, Ilarregui JM, Croci DO, Correale J, Hernandez JD, Zwirner NW, Poirier F, Riley EM, Baum LG, 2007. Differential glycosylation of TH1, TH2 and TH-17 effector cells selectively regulates susceptibility to cell death. *Nature Immunol.*, 8(8): 825 - 834.

Valenzuela JG, Francischetti IM, Pham VM, Garfield MK, Ribeiro JM, 2003. Exploring the salivary gland transcriptome and proteome of the *Anopheles stephensi* mosquito. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 33(7): 717 - 732.

Yang RY, Rabinovich GA, Liu FT, 2008. Galectins: structure, function and therapeutic potential. *Expert Rev. Mol. Med.*, 10: e17.

Yoshida H, Yamashita S, Teraoka M, Itoh A, Nakakita S, Nishi N, Kamitori S, 2012. X-ray structure of a protease-resistant mutant form of human galectin-8 with two carbohydrate recognition domains. *FEBS Journal*, 279(20): 3937 - 3951.

(责任编辑: 赵利辉)